

ヌードマウス下肢虚血モデルに対する
ヒト脱分化脂肪細胞移植の血管再生効果
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系機能生理学専攻

加藤 礼保納
修了年 2021年
指導教員 越永従道

ア) 緒言

近年、末梢動脈疾患(peripheral artery disease: PAD)の患者数は著しい増加がみられる。重篤化すると重症下肢虚血(critical limbs ischemia: CLI)に陥り、血管内治療やバイパス療法などの外科的血行再建術が選択されるが、下肢切断に至る症例も稀ではない。しかしながら、全身状態不良のため加療に耐えられない症例や、治療適応のない末梢病変を主因とした CLI も多数存在している。

重症下肢虚血(critical limbs ischemia: CLI)に対する新しい治療法として、細胞治療による血管再生治療が注目されている。間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)は、高い増殖能と骨、軟骨、脂肪などの中胚葉組織への多分化能を有する細胞で再生医療用細胞ソースとして広く臨床応用されている。特に脂肪組織に含まれる MSC は脂肪組織由来幹細胞(adipose-derived stem cell: ASC)と呼ばれ、骨髄より組織の機能を損なわずに大量採取できるため近年注目が集まっている。骨髄 MSC や ASC は数々の血管新生因子を分泌するとともに、血管内皮細胞やペリサイトといった血管細胞への分化能を有し、下肢虚血モデル動物への移植実験において高い血流改善効果が示されている。一方で、骨髄 MSC や ASC は、ヘテロな細胞集団であることが指摘されており、また細胞品質もドナーの年齢や基礎疾患に影響を受けることが報告されている。

脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell; DFAT)は、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養で体外培養することで調製される MSC に類似した多能性細胞である¹⁾。DFAT は、ドナー年齢に影響されず約 1g の脂肪組織から患者年齢や基礎疾患に影響されず均一な MSC 様細胞を簡便に大量調製できるため、新たな血管再生治療用細胞として期待されている。今後 DFAT を血管再生治療用の細胞医薬品として開発するためには、臨床で用いるヒト DFAT の血流改善効果の作用メカニズムを明確にするとともに、ASC といった既存の治療用細胞との差異を明確にする必要がある。本研究では免疫不全ヌードマウス下肢虚血モデルに、臨床用ヒト DFAT を虚血筋肉内投与し、側副血行路の発達や虚血筋肉組織における微小血管の増生を組織学的に評価した。同時にヒト ASC 移植群との比較により血管再生に関する作用の差異を検討した。

イ) 対象と方法

1. 動物

BALB/c-nu ヌードマウス(10 週齢、雄性)を使用した。動物実験は、日本大学医学部動物実験指針に定められた方法に従い日本大学動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号: AP19MED076-1)。

2. DFAT 及び ASC の調製

ヒト検体を用いたすべての実験は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を受け実施した(承認番号: RK-160209-6)。60 歳女性患者から事前に同意を得て、提供された皮下吸引脂肪組織を細胞原料として用いた。DFAT と ASC の調製は、既報¹⁾に従い、脂肪組織をコラゲナーゼ処理、フィルトレー

ション、低速度遠心分離を行った後、DFAT は成熟脂肪細胞を含む浮遊層を採取し、天井培養を行い調製した。また ASC は沈降分画である間質血管分画 Stromal vascular fraction (SVF)を採取後、付着培養を行い調製した。

3. フローサイトメトリー解析

DFAT および ASC(P1)に対し、フローサイトメトリー解析を行った。使用した抗体は、MSC マーカーとして Phycoerythrin(PE)標識抗ヒト CD73、CD90、CD105 抗体、MSC 陰性マーカーとして、PE 標識抗ヒト CD31、CD45、HLA-DR 抗体を用いた。またネガティブコントロールとして PE 標識抗マウス IgG1、IgG2 抗体を使用した。細胞表面抗原の測定は、FACSCalibur フローサイトメーターを使用し、生細胞のみを解析した。解析は FlowJo ソフトウェア(version 9, FlowJo LLC)を用いて行い、ネガティブコントロールの蛍光強度と比較し、ヒストグラムを作製した。

4. In vitro 多分化能解析

ASC、DFAT をそれぞれコンフルエントになるまで培養した。骨分化誘導実験は、骨分化誘導培地にて 3 週間培養した。評価は、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、アルカリホスファターゼ染色キットを用いたアルカリホスファターゼ染色を行った。また他の細胞は 1%アリザンレッド S を作用させ、カルシウム沈着を可視化した。

脂肪分化誘導実験はコンフルエントとなった細胞を脂肪分化誘導培地にて 3 週間培養した。評価は、細胞を固定後、Oil red O 染色を行い、中性脂肪の細胞内蓄積を可視化した。

5. 下肢虚血モデルの作製

マウス下肢虚血モデル作製は Limbourg ら²⁾による方法に従って行った。イソフルラン深麻酔下にマウス左大腿部を皮膚切開し、左大腿動静脈を露出した。大腿深動脈の分岐部より遠位にて大腿動脈のみ結紮することにより虚血を作製した。その後、レーザードップラー血流画像化装置(Periscan system PIM2)を用い、健常側と虚血側の血流量の測定を行い、結紮側の下肢虚血が起こっていることを確認し、移植実験に用いた。

6. 細胞移植実験

前項に基づき、イソフルラン麻酔下に計 30 頭のヌードマウスに下肢虚血を作製した。虚血作製 2 日後に 3 群に群分けし、DFAT 群(n = 10)はヒト DFAT($5 \times 10^5/200 \mu\text{l}$)を虚血肢の内転筋群に 3 か所に分けて筋肉内投与を行った。ASC 群(n = 10)はヒト ASC($5 \times 10^5/200 \mu\text{l}$)を同様に筋肉内投与した。また Control 群(n = 10)として生理食塩水(200 μl)を同様に筋肉内投与した。モデル作製 0 日目 (モデル作製時)、2 日目 (筋肉内投与時)、7 日目、14 日目、21 日目に下肢虚血の程度を肉眼的に観察し、後述の虚血スコアによるスコアリングを行った。モデル作成後 21 日の時点で安楽死を行い、両側下肢を摘出後、大腿筋群および腓腹筋を剥離し、後述の組織学的評価を行った。

7. 虚血スコアによる肉眼的評価

虚血肢における虚血の肉眼的評価は、Westvik ら³⁾により報告された Modified ischemia score を用いた。健側肢と同様に全く虚血性変化がないものをフルスコアの7点とし、爪の変色や、指の変色、壊死の範囲に基づき減点しスコアリングした。

8. 側副血管の組織学的評価

イソフルラン深麻酔下に還流固定を行った。その後両側下肢を摘出し、24時間固定後、大腿筋群を切離した。組織切片標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン Hematoxylin Eosin (HE)染色を行い観察した。まず大腿筋群の中の神経血管束に存在する小動脈を同定し、血管面積と血管内腔面積を測定し、以下の計算式により血管壁面積比を算出した。

・血管壁面積 = (血管面積-血管内腔面積)

・血管壁面積比 = (虚血側血管壁面積/健常側血管壁面積)

側副血管が発達すると血流が増加し側副血管の血管壁が厚くなる特徴があるため、健常側と虚血側の血管壁面積比を算出することにより、側副血管発達の程度を定量評価することができる。

9. 腓腹筋血管密度の組織学的評価

イソフルラン深麻酔下に還流固定を行った。その後両側下肢を摘出し、24時間固定後、腓腹筋を切離した。組織切片標本を作製し、蛍光免疫染色を行った。一次抗体として血管内皮細胞マーカーであるビオチン標識 isolectin B4 (IB4)(1:100 希釈, clone B-1205)、血管平滑筋マーカーであるウサギ抗平滑筋 α アクチン(ASMA)抗体(1:200 希釈, clone ab5694)を用いた。二次抗体として Alexa Fluor 488 標識ストレプトアビジン(1:1000 希釈)、Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(1:1000 希釈)を用いた。核染色として 2 μ g/ml Hoechst 33342 を室温にて 30 分反応させ、観察した。血管密度の定量は蛍光顕微鏡下 (20 倍対物レンズ使用) にランダム 3 視野写真撮影を行い、IB4 陽性血管数および IB4 と ASMA 二重陽性血管数を計測し、3 視野中の総血管数を算出した。

10. 統計解析

実験データは mean \pm SD で示した。大腿筋組織における側副血管壁面積比、腓腹筋組織における血管密度の群間比較は、One-way analysis of variance (ANOVA)にて検定を行った後、Post-hoc 検定として Tukey's multiple comparison test を行い評価した。P<0.05 を有意水準とした。

ウ) 結果

1. 移植細胞の形質機能解析結果

調製した DFAT と ASC のフローサトメトリー解析を行った結果、DFAT、ASC 共に MSC マーカーである CD73、CD90、CD105 はいずれも 99%以上の高い陽性

率を示した。一方 DFAT、ASC 共に MSC 陰性マーカーである CD31、CD45、HLA-DR はいずれも 0.1%未満で、異種細胞の混入率が低いことが示された。多分化能の解析では、DFAT、ASC 共に、同程度の脂肪分化能および骨分化能が確認された。以上の結果から、移植実験に用いる DFAT および ASC が均質で多分化能を維持した細胞であることを確認した。

2. マウス下肢虚血モデルに対する DFAT 移植の効果 (虚血スコアによる評価)

次にマウス下肢虚血モデルに対する DFAT 移植の効果を検討した。Modified ischemia score による肉眼的虚血性変化の評価を行った結果、モデル作成 21 日目 (移植後 19 日目) の観察終了時点におけるスコアは、統計学的有意差はないものの、DFAT 群 > ASC 群 > Control 群の順で虚血性変化の程度が軽い傾向にあることが示された。

3. マウス下肢虚血モデルに対する DFAT 移植の効果(側副血行路の評価)

虚血側と健常側の側副血管壁面積比を定量評価した結果、DFAT 群 > ASC 群 > Control 群の順に高く、DFAT 群は Control 群や ASC 群に比べて有意($P < 0.05$)に側副血管壁面積比が高いことが示された。この結果より、DFAT 投与により側副血行路の発達が増強されることが明らかになった。

4. マウス下肢虚血モデルに対する DFAT 移植の効果(腓腹筋の組織学的評価)

虚血側腓腹筋の血管密度を定量評価した結果、IB4⁺血管数は、DFAT 群 > ASC 群 > Control 群の順に多く、DFAT 群と ASC 群は Control 群に比べて有意($P < 0.01$)に血管数が多く、さらに DFAT 群は ASC 群と比較しても有意($P < 0.05$)に血管数が多かった。IB4⁺ASMA⁺血管数の評価では、DFAT 群は Control 群や ASC 群に比べて 2 倍以上と有意($P < 0.01$)に血管数が多いことが示された。以上の結果より、DFAT 投与により腓腹筋の血管密度増加が促進し、特に平滑筋細胞を伴う成熟度の高い血管が誘導されることが明らかになった。

エ) まとめ

本研究では免疫不全マウス下肢虚血モデルに対し、臨床用ヒト DFAT を虚血筋肉内投与し、側副血行路の発達や虚血筋肉組織における微小血管の増生を組織学的に評価した。同時にヒト ASC 移植群との比較により血管再生に関する作用の差異を検討した。その結果、DFAT は ASC に比べ側副血管を発達させる作用が強いことを明らかにした。さらに DFAT は ASC に比べ虚血筋肉組織における血管新生作用が強く、特に平滑筋細胞を伴う成熟度の高い血管を有意に増やすことを明らかにした。ASC といった既存の治療用細胞に比べ、DFAT は侵襲性、効率性、安全性のみならず、血管再生作用の面でも優位性が高いことが示された。

【引用文献】

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210-222.
- 2) Limbourg A, Korff T, Napp LC, et al. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* 2009; **4**: 1737-1746.
- 3) Westvik TS, Fitzgerald TN, Muto A, et al. Limb ischemia after iliac ligation in aged mice stimulates angiogenesis without arteriogenesis. *J Vasc Surg* 2009; **49**: 464-473.